

文章编号:1001-7380(2016)05-0001-07

川山茶 ISSR-PCR 及 SSR-PCR 优化体系建立及比较

刘家艳¹, 权俊萍^{1*}, 沈薛洁¹, 卢娟芳², 田 波¹, 陈启航¹

(1.重庆市南山植物园管理处,重庆 400065;2.西南大学园艺园林学院,重庆 400716)

摘要:以川山茶品种“茶睡莲”为试验材料,以改良 CTAB 法提取高质量 DNA,采用正交设计 $L_{16}(4^5)$,探讨了 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、TaqDNA 聚合酶和模板 DNA 浓度对川山茶 ISSR-PCR 和 SSR-PCR 反应体系的影响。建立了相关优化体系:20 μ L 的 ISSR-PCR 扩增体系中含 20 ng 模板 DNA,2 μ L 10 \times Buffer,2 mmol/L Mg^{2+} ,0.15 mmol/L dNTPs,0.6 μ mol/L 引物和 1 U TaqDNA 聚合酶,扩增退火温度为 55 $^{\circ}$ C,35 个循环;20 μ L 的 SSR-PCR 扩增体系中含 50 ng 模板 DNA,2.5 mmol/L Mg^{2+} ,0.05 mmol/L dNTPs,0.2 μ mol/L 引物和 0.5 U TaqDNA 聚合酶,最佳退火温度为 52 $^{\circ}$ C,最佳循环数为 38。应用该优化体系,分别用 27 个川山茶品种 DNA 进行了 ISSR-PCR 扩增和 SSR-PCR 扩增,结果显示,建立的优化体系具有较高稳定性。

关键词:川山茶;ISSR-PCR;SSR-PCR;引物;退火温度;TaqDNA 聚合酶;正交设计;优化体系

中图分类号:S685.14 **文献标志码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2016.05.001

Optimization of Sichuan *Camellia* ISSR-PCR and SSR-PCR reaction systems

LIU Jia-yan¹, QUAN Jun-ping^{1*}, SHEN Xue-jie¹, LU Juan-fang²,

TIAN Bo¹, CHEN Qi-hang¹

(1.Nanshan Botanical Garden Management Office, Chongqing 400065, China;

2.School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract:To obtain stable ISSR-PCR and SSR-PCR amplification systems of *Camellia japonica*, the optima were explored by the orthogonal design in 5 factors (DNA template, Mg^{2+} , dNTPs, primers and Taq DNA polymerase) at 4 levels with variety ‘Chashuilian’ as tested material. The experimental results showed that the optimized ISSR-PCR system for *Camellia japonica* ‘Chashuilian’ was established as follows, 20 ng DNA template, 2 μ L 10 \times Buffer, 2 mmol/L Mg^{2+} , 0.15 mmol/L dNTPs, 0.6 μ mol/L primer and 1 U Taq DNA polymerase and the optimal annealing temperature was 55 $^{\circ}$ C for UBC853 primer. And the optimized SSR-PCR system was established as follows, 50 ng DNA template, 2 μ L 10 \times Buffer, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.05 mmol/L dNTPs, 0.2 μ mol/L primer and 0.5 U Taq DNA polymerase and the optimal annealing temperature was 52 $^{\circ}$ C for A55 primer. After 27 cultivars of Sichuan *Camellia* were used to test the stabilization of the optimized reaction system, respectively, the results indicated that the optimized reaction system was very stable.

Key words:Sichuan *Camellia*;ISSR-PCR;SSR-PCR;Primer;Annealing temperature;Taq DNA polymerase;Orthogonal design;Optimized system

山茶是山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)中以观赏为主要栽培目的的种、变种、品种等的统称。它栽培历史悠久,具有很大观赏价值,名列我国十大传统名花珍贵花木,也是世界名贵花卉之一。我国是世界上山茶属植物原产地和起源中心,是山茶

属植物资源最丰富的国家。中国植物志记载约 239 种,其中 90%以上分布于我国南部和西南部^[1]。山茶在巴蜀地区栽培已有 2 000 a 以上的历史,重庆地区凡园、风景区、庭院、楼台均有种植,形成了非常有区域特色传统的川山茶栽培类群,多年来已发展

收稿日期:2016-07-05;修回日期:2016-09-05

基金项目:重庆市科学技术委员会基础前沿研究项目(cstc2014jcyjA1669);重庆市园林局科技示范项目(园科字 2013(9))

作者简介:刘家艳(1990-),女,湖北仙桃人,硕士。主要从事园林植物研究。E-mail: 1143076282@qq.com。

* 通信作者:权俊萍(1973-),女,新疆石河子人,高级工程师,博士。研究方向:园艺园林植物种质资源及遗传育种。

成为重庆市文化内涵的重要组成部分。

重庆南山植物园是我国乃至世界茶花种质资源库的重要基地。这里收集了山茶属相关种质 600 余份(包括种及各类栽培品种,如山茶类、滇茶类、油茶类、金花茶类等),并于 2012 年被国际茶花协会命名为“国际杰出茶花园”。川山茶是南山植物园山茶属资源种质中的重要特色栽培类群,其花姿丰盈、端庄高雅,品种多样,花期长,花色鲜艳,瓣型丰富,尤其对重庆地区有着良好的生态适应能力,抗污染,易栽培,优良性状表现突出,具有较高的观赏及推广价值。

ISSR (Inter simple sequence repeat) 和 SSR (Simple sequence repeats)是近年来广泛使用于各类植物研究的分子标记技术,具有试验操作简单、稳定性好、多态性丰富等优点,在进行植物遗传多样性分析、种质鉴定、遗传连锁图的构建、基因连锁标记的寻找与基因定位和比较基因组学研究等方面得到了很好的应用^[2-4]。本研究在预试验基础上,选择了对 PCR 扩增体系稳定性影响较大的 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、TaqDNA 聚合酶和模板 DNA 浓度 5 个因子进行体系优化试验,并在不同川山茶品种资源中进行初步应用与比较,以期建立起适合于川山茶品种的稳定的 ISSR-PCR 和 SSR-PCR 反应体系,为今后开展山茶的资源鉴定、品种选育以及系统进化与遗传多样性方面的研究奠定良好的试验基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试川山茶品种材料均采自重庆南山植物园,于 2015 年 8 月采集当年生新叶,提取高质量 DNA,用于相关扩增体系优化的研究。

1.2 试剂及仪器

试验中 dNTP mixture, 10×PCR buffer, Mg^{2+} , Taq 聚合酶和 DNA marker 等试剂均购自 Takara 公司;引物由上海生工生物工程公司合成。试验使用主要仪器有 C1000PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司), BIO-RAD 凝胶成像系统, MIKKO 22R 台式高速冷冻离心机; DYY-6C 电泳仪; JY-JX5 垂直电泳槽; DK-S26 电热恒温水浴锅; 754PC 型紫外分光光度计(上海菁华公司生产)。

1.3 方 法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 采用改良的 CTAB 法^[5]提取山茶基因组 DNA, 1.5% 的琼脂糖凝胶电

泳检测 DNA 的质量,将提取的 DNA 浓度稀释至 4 ng/ μ L,保存在 4℃ 冰箱待用。未稀释的 DNA 原液 -20℃ 保存。

1.3.2 正交试验设计方案 选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表(见表 1,2)。用川山茶品种“茶睡莲”DNA 为模板,以 ISSR 引物 UBC853 和 SSR 引物 A55 进行试验,加入 2 μ L 10×Buffer,以超纯水补足,总体积均为 20 μ L,重复 2 次。

表 1 川山茶 ISSR-PCR 正交试验设计 $L_{16}(4^5)$

编号	TaqDNA 聚合酶/U	Mg^{2+} / (mmol/L)	模板 DNA/ (ng)	dNTPs/ (mmol/L)	引物/ (μ mol/L)
1	0.50	1.0	20	0.10	0.3
2	0.50	1.5	30	0.15	0.4
3	0.50	2.0	40	0.20	0.5
4	0.50	2.5	50	0.25	0.6
5	0.75	1.0	30	0.20	0.6
6	0.75	1.5	20	0.25	0.5
7	0.75	2.0	50	0.10	0.4
8	0.75	2.5	40	0.15	0.3
9	1.00	1.0	40	0.25	0.4
10	1.00	1.5	50	0.20	0.3
11	1.00	2.0	20	0.15	0.6
12	1.00	2.5	30	0.10	0.5
13	1.25	1.0	50	0.15	0.5
14	1.25	1.5	40	0.10	0.6
15	1.25	2.0	30	0.25	0.3
16	1.25	2.5	20	0.20	0.4

表 2 川山茶 SSR-PCR 反应正交试验设计 $L_{16}(4^5)$

编号	TaqDNA 聚合酶/U	Mg^{2+} / (mmol/L)	模板 DNA/ (ng)	dNTP/ (mmol/L)	引物/ (μ mol/L)
1	0.25	1.5	20	0.05	0.1
2	0.25	2.0	30	0.10	0.2
3	0.25	2.5	40	0.15	0.3
4	0.25	3.0	50	0.20	0.4
5	0.5	1.5	30	0.15	0.4
6	0.5	2.0	20	0.20	0.3
7	0.5	2.5	50	0.05	0.2
8	0.5	3.0	40	0.10	0.1
9	0.75	1.5	40	0.20	0.2
10	0.75	2.0	50	0.15	0.1
11	0.75	2.5	20	0.10	0.4
12	0.75	3.0	30	0.05	0.3
13	1.00	1.5	50	0.10	0.3
14	1.00	2.0	40	0.05	0.4
15	1.00	2.5	30	0.20	0.1
16	1.00	3.0	20	0.15	0.2

1.3.3 PCR 反应条件及电泳、成像 ISSR-PCR 扩增程序为 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 次循环, 72 ℃ 最后延伸 10 min, 扩增完后 4 ℃ 保存; SSR-PCR 扩增程序为 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 38 次循环, 72 ℃ 最后延伸 5 min, 扩增完后 4 ℃ 保存。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, Gelred 染色, 在 BIO-RAD 凝胶成像系统成像。

1.3.4 退火温度的确定 根据正交试验, 选择最佳反应体系对退火温度进行梯度试验, 使用梯度 PCR 仪。ISSR-PCR 设定 45—57 ℃ 的退火温度梯度范围, 自动生成 8 个温度, 即 45, 45.8, 47.4, 49.7, 52.6, 55, 56.3 ℃ 和 57 ℃, 进行 ISSR-PCR 退火温度的扩增比较, 每个梯度设定 6 个重复; SSR-PCR 设定 50—60 ℃ 的退火温度梯度范围, 自动生成 8 个温度, 即 50, 50.7, 52, 53.9, 56.3, 58.3, 59.4 ℃ 和 60 ℃, 进行 SSR-PCR 退火温度的扩增比较, 每个梯度设定 2 个重复。除退火温度外, 反应程序与正交试验设计相同。

1.3.5 最佳体系与程序验证 用建立的 ISSR-PCR 及 SSR-PCR 最佳反应体系和程序对 27 个川山茶品种分别进行扩增稳定性验证。

2 结果与分析

2.1 PCR 正交结果分析

2.1.1 PCR 正交试验直观分析 根据表 1, 2 设计的 16 个处理进行 PCR 反应后, 每组 2 个重复, 电泳结果如图 1, 2 所示。将 16 个处理按照电泳图的条带扩增数、清晰度和背景均匀性等表现进行综合打分, 分为 1—16 个等级, 条带数量丰富、清晰、稳定的最佳产物记为 16 分, 最差记 1 分。2 次重复分别独立统计, ISSR-PCR 正交试验 16 个组合的分数依次为 2, 1; 1, 1; 4, 1; 4, 2; 1, 1; 1, 1; 11, 11; 10, 10; 1, 1; 5, 1; 13, 13; 11, 11; 5, 5; 9, 9; 6, 8; 8, 8。SSR-PCR 正交试验 16 个组合的分数依次为 7, 6; 6, 7; 8, 8; 9, 10; 7, 7; 7, 7; 14, 14; 13, 13; 6, 6; 10, 10; 12, 12; 12, 12; 7, 6; 9, 9; 9, 8; 9, 10。根据打分, 求出各个因素在同一水平下的试验值之和 K_i 和每个因素水平下的数据平均值 k_i , 以及每个因素不同水平间平均值的极差 R (表 3, 4)。极差 R 越大, 表明影响因素对于反应体系的影响越大。结果显示, 各因素水平的变化对川山茶“茶睡莲”ISSR-

PCR 反应的影响从小到大依次为 Mg^{2+} > TaqDNA 聚合酶 > dNTP > 引物 > 模板 DNA; 各因素水平的变化对 SSR-PCR 反应的影响从小到大依次为 Mg^{2+} > TaqDNA 聚合酶 = dNTP > 模板 DNA > 引物。

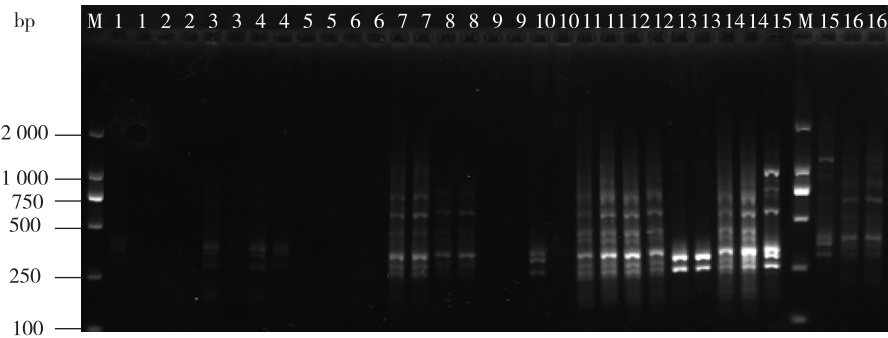
表 3 ISSR-PCR 正交设计直观分析

结果	TaqDNA 聚合酶	Mg^{2+}	模板 DNA	dNTP	引物
K_1	8	8.5	23.5	32.5	21.5
K_2	23	14	20	29	21
K_3	28	33.5	22.5	14.5	19.5
K_4	29	32	22	12	26
k_1	2	2.125	5.875	8.125	5.375
k_2	5.75	3.5	5	7.25	5.25
k_3	7	8.375	5.625	3.625	4.875
k_4	7.25	8	5.5	3	6.5
R	5.25	6.25	0.875	5.125	1.625

表 4 SSR-PCR 正交设计直观分析

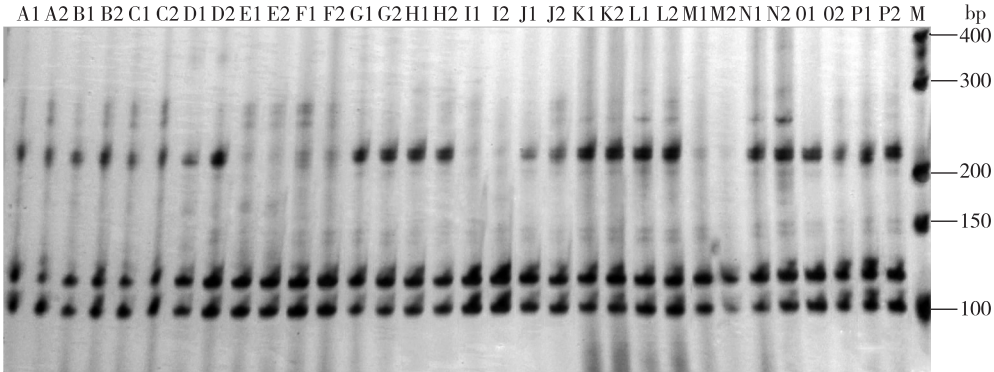
结果	TaqDNA 聚合酶	Mg^{2+}	模板 DNA	dNTP	引物
K_1	30.5	26	35	41.5	38
K_2	41	32.5	34	38	36
K_3	40	42.5	36	34.5	33.5
K_4	33.5	44	40	31	37.5
k_1	7.625	6.5	8.75	10.375	9.5
k_2	10.25	8.125	8.5	9.5	9
k_3	10	10.625	9	8.625	8.375
k_4	8.375	11	10	7.75	9.375
R	2.625	4.5	1.5	2.625	1.125

各因素水平下的数据平均值 k_i 反映了各水平因素对反应体系的影响情况, k_i 值越大, 表明反应水平越好^[6]。由表 3, 4 可知, 反应中的 5 个影响因素的最佳反应水平组合 (1.25 U TaqDNA 聚合酶, 2 mmol/L Mg^{2+} , 20 ng 模板 DNA, 0.1 mmol/L dNTPs, 0.6 μ mol/L 引物) 并没有在正交表中出现, 但与分值最高的 11 号组合接近, 仅 TaqDNA 聚合酶和 dNTPs 的用量不同; SSR-PCR 反应中的 5 个影响因素的最佳反应水平组合 (0.5 U TaqDNA 聚合酶, 3 mmol/L Mg^{2+} , 50 ng 模板 DNA, 0.05 mmol/L dNTPs, 0.1 μ mol/L 引物) 与分值最高的 7 号组合接近, 仅 Mg^{2+} 和引物的用量不同。



1—16 对应表 1 的 1—16 编号,每组 2 个重复

图 1 川山茶“茶睡莲”ISSR-PCR 正交试验电泳结果(引物 UBC853)



A—P 对应表 2 的 1—16 编号,每组 2 个重复

图 2 川山茶“茶睡莲”SSR-PCR 正交试验电泳结果(引物 A55)

2.1.2 正交设计方差分析 用 SPSS 软件对试验结果进行方差分析(见表 5,6)和多重比较分析(见图 3,4)。可知,ISSR-PCR 方差分析中,除模板 DNA 和引物,其余因素(Mg^{2+} ,TaqDNA 聚合酶,dNTPs)各水平对试验结果的影响均达到极显著水平($P \leq 0.01$);SSR-PCR 方差分析中,全部设计因素各水平对试验结果的影响均达到极显著水平($P \leq 0.01$),可进一步进行因素内多重比较分析。

表 5 ISSR-PCR 正交设计方差分析					
变异来源	方差	自由度	均方	F 值	P
Taq DNA 聚合酶	141.00	3	47.00	44.235 **	0
Mg^{2+}	239.25	3	79.75	75.059 **	0
模板 DNA	3.25	3	1.083	1.02	0.410
dNTPs	157.75	3	52.583	49.49 **	0
引物	11.75	3	3.917	3.686	0.034
误差	17.00	16	1.063		
总计	1 538	32			

** 代表 $P < 0.01$ 水平上的差异极显著

表 6 SSR-PCR 正交设计方差分析					
变异来源	方差	自由度	均方	F 值	P
Taq DNA 聚合酶	38.625	3	12.875	68.667 **	0
Mg^{2+}	109.125	3	36.375	194.000 **	0
模板 DNA	10.375	3	3.458	18.444 **	0
dNTPs	30.625	3	10.208	54.444 **	0
引物	6.125	3	2.042	10.889 **	0
误差	3.000	16	0.188		
总计	2 826.000	32			

** 代表 $P < 0.01$ 水平上的差异极显著

ISSR-PCR 多重比较分析表明,在 20 μ L 反应体系中,Taq 酶量在 0.75 U 与 1 U,1 U 与 1.25 U 水平间的差异不显著,0.5 U 与 0.75 U 水平间的差异达到显著水平。由图 1 可知,Taq 酶量为 1 U 时(9—12 号处理)要比 0.75 U(5—8 号处理)和 1.25 U(13—16 号处理)时产生的条带略稳定、清晰,故确定 1 U 为 Taq 酶最佳水平; Mg^{2+} 浓度在 1 mmol/L 和 1.5 mmol/L,2 mmol/L 和 2.5 mmol/L 水平间差异不显著,但在 1.5 mmol/L 和 2 mmol/L 水平间的差异显著,结合图 1,确定最佳 Mg^{2+}

浓度为 2 mmol/L;同样的分析可以确定本试验 dNTPs 最佳浓度为 0.15 mmol/L。

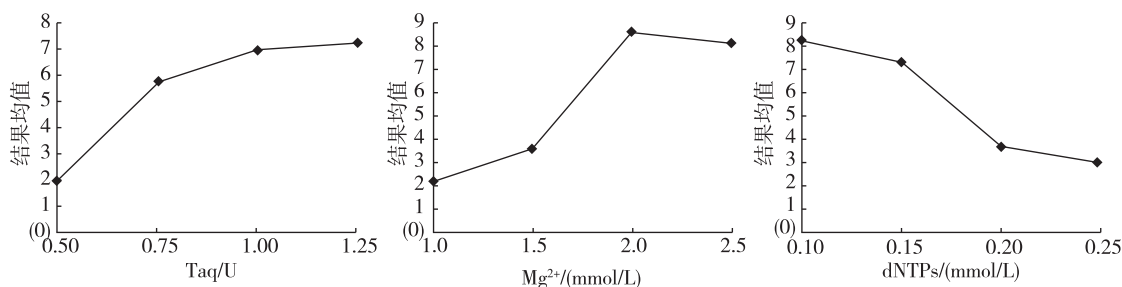


图3 ISSR-PCR 体系 Taq 酶量、Mg²⁺和 dNTPs 浓度分别与各结果均值关系

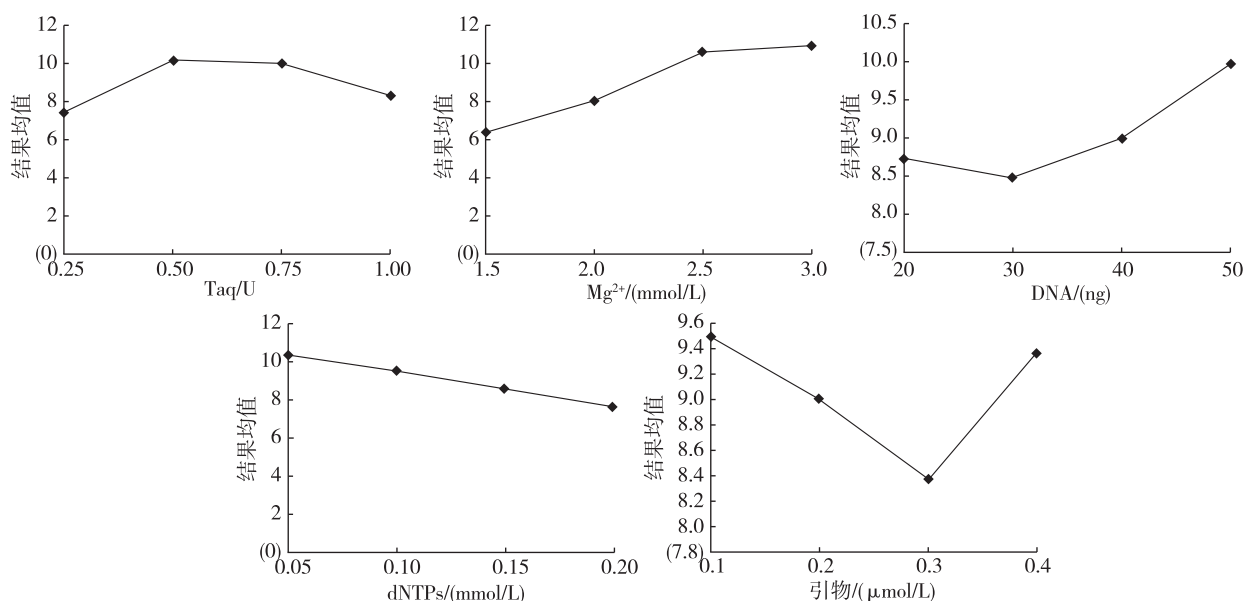


图4 SSR-PCR 体系 Taq 酶量、Mg²⁺浓度、DNA 浓度、dNTPs 和引物分别与各结果均值关系

同理,SSR-PCR 多重比较分析表明,在 20 μL 反应体系中,0.5 U 为最佳水平,Mg²⁺ 最佳浓度为 2.5 mmol/L,DNA 最佳浓度为 50 ng,dNTPs 最佳浓度为 0.05 mmol/L,引物最佳浓度为 0.2 μmol/L。结果显示,SSR-PCR 反应所需 Taq 酶量、dNTPs 和引物所需量均少于 ISSR-PCR 反应,表明川山茶分子标记试验中,SSR-PCR 反应比 ISSR-PCR 反应具有更高的灵敏性。

2.2 退火温度对 ISSR-PCR 和 SSR-PCR 的影响

根据正交试验结果,ISSR-PCR 体系选择 11 号处理组合,SSR-PCR 体系选择 7 号组合,进行退火温度梯度试验。由图 5,6 可知,8 个梯度的退火温度均能扩增出条带。反应温度太低或太高时,条带较模糊。在 ISSR-PCR 反应中,45,45.8,47.4,56.3 °C 和 57 °C 条带较模糊,49.7,52.6 °C 和 55 °C 条带

较清晰,但是 49.7 °C 和 52.6 °C 背景色较深,综合考虑,ISSR-PCR 最佳退火温度为 55 °C;SSR-PCR 反应中,50,50.7,58.3,59.4 °C 和 60 °C 号带较模糊,52,53.9,56.3 °C 号带较明显,但是 53.9,56.3 °C 号带背景色稍深。所以综上所述,SSR-PCR 最佳退火温度为 52 °C。

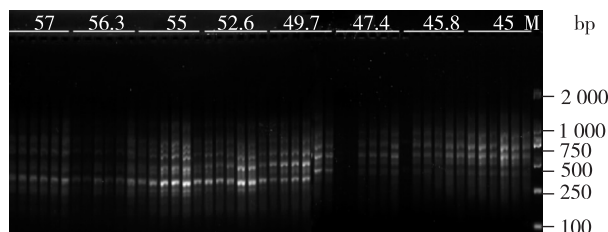


图5 不同退火温度对川山茶“茶睡莲”ISSR-PCR 的影响

2.3 川山茶 ISSR-PCR 及 SSR-PCR 最佳反应体系的验证

分别用 27 个川山茶品种的 DNA 对优化获得的最佳 ISSR-PCR 反应体系 (20 ng 模板 DNA, 2 μ L 10 \times Buffer, 2 mmol/L Mg^{2+} , 0.15 mmol/L dNTPs, 0.6 μ mol/L 引物和 1 U TaqDNA 聚合酶, 扩增退火温度为 55 $^{\circ}C$, 35 个循环) 及最佳 SSR-PCR 反应体系 (50 ng 模板 DNA, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.05 mmol/L dNTPs, 0.2 μ mol/L 引物和 0.5 U TaqDNA 聚合酶, 退火温度为 52 $^{\circ}C$, 循环数为 38) 及扩增程序进行验证, 结果见图 7。结果显示扩增产物条带清晰可见,

主带明显, 多态性高, 表明已建立的反应体系及扩增程序稳定性较好。

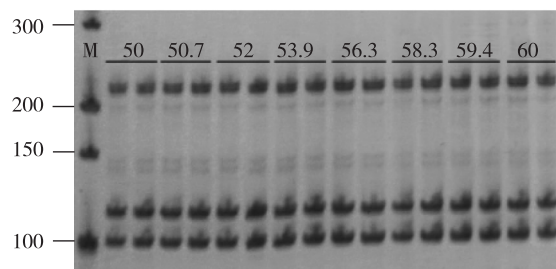
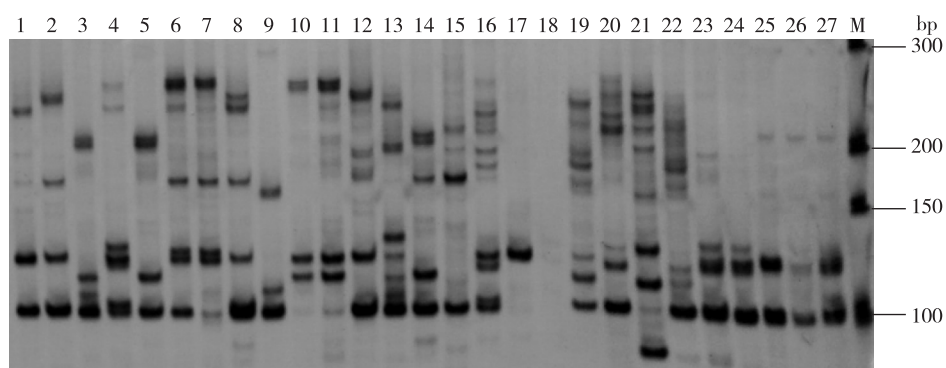
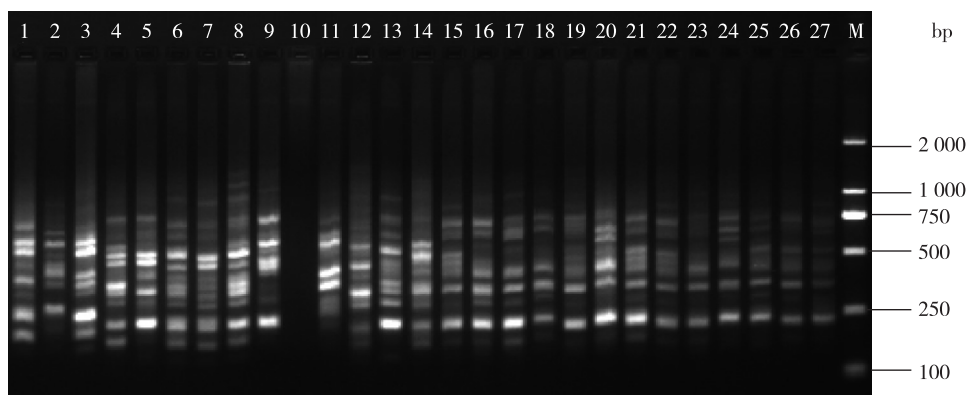


图 6 不同退火温度对川山茶“茶睡莲”SSR-PCR 的影响



(a)



(b)

1 白宝塔 (*Camellia japonica* 'Baibaota'), 2 赤壁金心 (*C. pitardii* 'Chibijinxin'), 3 重庆红 (*C. japonica* 'Chongqinghong'), 4 吊金钟 (*C. japonica* 'Diaojinzhong'), 5 白洋片 (*C. japonica* 'Baiyangpian'), 6 肥蟹茶 (*C. japonica* 'Feibiecha'), 7 革命旗 (*C. japonica* 'Gemingqi'), 8 黑艳红 (*C. japonica* 'Heiyanhong'), 9 白玉片 (*C. japonica* 'Baiyupian'), 10 花五宝 (*C. japonica* 'Huawubao'), 11 粉五宝 (*C. japonica* 'Fenwubao'), 12 花洋红 (*C. japonica* 'Huayanghong'), 13 金顶大红 (*C. japonica* 'Jindingdahong'), 14 南山宝珠 (*C. japonica* 'Nanshanbaozhu'), 15 九心十八瓣 (*C. japonica* 'Jiuxinshibaban'), 16 紫金冠 (*C. japonica* 'Zijinguan'), 17 醉杨妃 (*C. japonica* 'Zuiyangfei'), 18 胭脂鳞 (*C. japonica* 'Yanzhilin'), 19 川玛瑙 (*C. japonica* 'Chuanmanao'), 20 三学士 (*C. japonica* 'Sanxueshi'), 21 七心红 (*C. japonica* 'Qixinhong'), 22 七心白 (*C. japonica* 'Qixinbai'), 23 石榴茶 (*C. japonica* 'Shiliucha'), 24 露心宝珠茶 (*C. japonica* 'Luxinbaozhucha'), 25 铁壳宝珠 (*C. japonica* 'Tiekebaozhu'), 26 花丝莲 (*C. japonica* 'Huasilian'), 27 怒春红 (*C. japonica* 'Nuchunhong')

图 7 川山茶 ISSR-PCR (a) 与 SSR-PCR (b) 验证反应的扩增结果

3 讨 论

ISSR 分子标记和 SSR 分子标记是基于 PCR 基础上的分子标记,反应中涉及到的各因子对不同物种扩增结果的特异性、稳定性及重复性有较大影响,因此对扩增体系进行优化是十分必要的^[7]。其中,PCR 反应是 ISSR 和 SSR 检测过程中一个重要的环节,建立稳定的 PCR 反应体系和扩增程序是 ISSR 和 SSR 分析的必要前提。该试验通过正交设计 $L_{16}(4^5)$ 对影响 PCR 扩增结果的 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、TaqDNA 聚合酶和模板 DNA 浓度等因素进行了探讨。相较于单因素试验设计的处理组合多、试验工作量大等不足,正交设计则分散均衡,整齐可比,效应明确,能够较快地找到最优的水平组合,节省了大量的时间以及人力物力。

本试验结果表明,ISSR-PCR 扩增体系除模板 DNA 和引物浓度外,其余因素对扩增效果的影响均达到极显著水平,其影响程度从大到小依次为 Mg^{2+} 、TaqDNA 聚合酶、dNTPs、引物、模板 DNA;SSR-PCR 扩增体系全部因子对扩增效果的影响均达到极显著水平,其影响程度从大到小依次为 Mg^{2+} 、TaqDNA 聚合酶、dNTPs、模板 DNA、引物。此结果也说明,川山茶 SSR-PCR 比 ISSR-PCR 扩增体系具有更高的实验灵敏度和影响条件的复杂性。

在 PCR 扩增反应中,dNTPs 浓度过低和过高均会影响到扩增条带的完整性和清晰度。浓度过低会降低扩增产物的得率及扩增条带较少,浓度过高会造成碱基的错误渗入而出现非特异性条带,还会导致引物二聚体的形成^[8-9]。

Mg^{2+} 浓度的高低会对 PCR 扩增产率和特异性造成较大影响^[6]。在所有因素中, Mg^{2+} 对扩增反应的结果影响最大,与卢莉等^[10] 研究的结果相似。模板 DNA、dNTPs、引物中的磷酸基团均可与 Mg^{2+} 结合,从而降低反应体系中游离 Mg^{2+} 的浓度;Taq 聚合酶对 Mg^{2+} 变化有着高灵敏反应,同时 Mg^{2+} 浓度还影响着引物的退火温度、模板与 PCR 产物的解链温度、产物的特异性和引物二聚体的形成。

引物的浓度是影响 PCR 扩增体系稳定性的另

一重要因素。当引物浓度偏低时会使扩增条带数目减少或不清晰,过高时会促使引物错误引导非特异性产物的合成以及引物二聚体的形成,它们的形成将会与靶序列竞争 Taq 聚合酶及 dNTP 从而导致靶序列扩增量的降低及扩增条带的错误^[11]。

将本研究建立的扩增体系应用于不同山茶品种的大批量扩增时,均能扩增出较为清晰的高质量条带,但前提是要尽可能保证不同样品间 DNA 的纯度、完整性和浓度的相对一致性,以减少扩增结果误差。此外,后续的研究也表明,本试验建立的优化体系同样适用于华东山茶、云南山茶、金花茶及杂交山茶的相关分子标记研究中。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:四十九卷第三册[M]. 北京:科学技术出版社,1998:4-5.
- [2] MARTI A F I, FORCADA C F I, COMPANY R S I, et al. Genetic relationships and population structure of local olive tree accessions from Northeastern Spain revealed by SSR markers[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 37(1): 1-12.
- [3] LIMA D F, MAUAD A V S, SILVA-PEREIRA V D, et al. Species boundaries inferred from ISSR markers in the *Myrcia laurifolia* complex (Myrtaceae)[J]. Plant Systematics and Evolution, 2014, 301(1): 353-363.
- [4] GUPTA M, VERMA B, KUMAR N, et al. Construction of intersubspecific molecular genetic map of lentil based on ISSR, RAPD and SSR markers[J]. Journal of Genetics, 2012, 91(3): 279-287.
- [5] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究种的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005: 20-30.
- [6] 桂腾琴,孙 敏,乔爱民,等. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系[J]. 果树学报,2009,26(1): 108-112.
- [7] 王廷华,景 强,Pierre Dubus. PCR 理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2006: 13-21.
- [8] 杨传平,潘 华,魏志刚,等. 白桦 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 东北林业大学学报, 2005,33(6): 1-3.
- [9] 谈 探,金则新,李钧敏,等. 山茶 ISSR 扩增条件的优化[J]. 福建林业科技,2007,34(2): 24-27.
- [10] 卢 莉,张 强,王玉花,等. 利用正交设计优化茶树 ISSR 反应体系[J]. 经济林研究,2010,28(1): 14-19.
- [11] 邹喻幸,葛 颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001: 36-90.